

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-277271

(43)Date of publication of application : 02.10.2003

(51)Int.Cl. A61K 31/7048
A23L 1/30
A61K 9/08
A61K 9/14
A61K 31/353
A61K 35/78
A61P 35/00
// C07H 17/065

(21)Application number : 2002-084666 (71)Applicant : KO NORIOKI
NATURAL WAY KK

(22)Date of filing : 26.03.2002 (72)Inventor : KO NORIOKI

(54) ANTICANCER DRUG

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an anticancer drug containing an anthocyanidin derivative extracted from a blueberry as an active ingredient.

SOLUTION: The anticancer drug comprises an active ingredient, a carrier, and other ingredients, and is characterized in that it contains an anthocyanidin derivative as the active ingredient and in that the anthocyanidin derivative is one that is extracted from the fruit of a blueberry.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.01.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-277271

(P2003-277271A)

(43) 公開日 平成15年10月2日 (2003.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
A 6 1 K 31/7048		A 6 1 K 31/7048	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 5 7
A 6 1 K 9/08		A 6 1 K 9/08	4 C 0 7 6
9/14		9/14	4 C 0 8 6
31/353		31/353	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-84666(P2002-84666)

(22) 出願日 平成14年3月26日 (2002.3.26)

(71) 出願人 502096004

侯 徳興

鹿児島県鹿児島市星ヶ峯2丁目41番1号

(71) 出願人 500314810

ナチュラルウェイ株式会社

東京都渋谷区恵比寿南2-21-2-302

(72) 発明者 侯 徳興

鹿児島県鹿児島市錦江台1丁目51-1-21

(74) 代理人 100064414

弁理士 磯野 道造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌剤

(57) 【要約】

【課題】 ブルーベリーから抽出されるアントシアニン誘導体を有効成分とする抗癌剤を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明は有効成分、キャリア及びその他の成分を含む抗癌剤であって、前記有効成分がアントシアニン誘導体であることを特徴とする抗癌剤であって、前記アントシアニン誘導体がブルーベリーの果実から抽出されたものであることを特徴とする抗癌剤を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アントシアニン誘導体を有効成分とすることを特徴とする抗癌剤。

【請求項2】 前記アントシアニン誘導体がブルーベリーの果実から抽出されたものであることを特徴とする請求項1に記載の抗癌剤。

【請求項3】 薬理的に認容された液体キャリア又は粉末キャリアを含むことを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の抗癌剤。

【請求項4】 請求項1から請求項3に記載の抗癌剤を含む健康補助食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アントシアニン誘導体を有効成分とする抗癌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ブルーベリーの果実には、アントシアニン誘導体であるアントシアニンが含まれている。このアントシアニンについては、視覚機能改善作用、体内の活性酸素除去作用、血管強化作用、抗炎症作用、抗潰瘍作用等の薬理効果を有していることが知られており、欧米では医薬品として認可されている。しかし、ブルーベリーより抽出されるアントシアニンの抗癌作用については今まで知られていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ブルーベリーから抽出されるアントシアニンの人体に及ぼす影響を研究する過程で知見を得たものであり、ブルーベリーから抽出されるアントシアニンを利用した新規な医薬及び健康補助食品を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、前記した課題を解決するために、請求項1に記載の発明は、アントシアニン誘導体を有効成分とすることを特徴とする抗癌剤である。

【0005】本発明者らは、発癌プロモーターTPAによる細胞癌化実験を行ったところ、アントシアニン誘導体、特に、ブルーベリーの果実から抽出したアントシアニン配糖体であるアントシアニンを含有した培地においては、細胞癌化が抑制されることを見出した。また、癌細胞にアントシアニンを添加したところ、癌細胞のアポトーシスが誘導されることを見出した。尚、これらの実験の詳細については後記する。

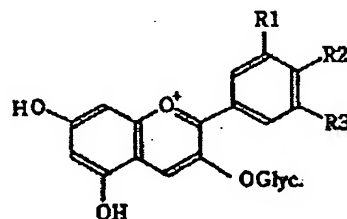
【0006】

【発明の実施の形態】【ブルーベリーについて】ブルーベリーは、ツツジ科ノキ属の植物であり、*V. shenii*、*V. australe*、*V. corymbosum*、*V. myrtillus*、*V. angustifolium*が知られている。この中でも、*V. myrtillus*は、果実中に後記のアントシアニンを多量に含んでおり、本実施の形態においても*V. myrtillus*の果実を用いて各種調査を行っている。

【0007】【アントシアニンについて】ブルーベリーの果実中に含まれるアントシアニン（アントシアニン誘導体）は、下記一般式で表されるアントシアニン骨格を有する。

【0008】

【化1】



【0009】（式中Glycは、アラビノース、グルコース、ガラクトースの何れか一種を示す。また式中R1、R2、R3は表1に示すような組合せを有する。）

【0010】

【表1】

	アントシアニン		
	R1	R2	R3
デルフィニジン	-OH	-OH	-OH
シアニン	-OH	-OH	-H
ペツニジン	-OH	-OH	-OCH ₃
ペオニジン	-OCH ₃	-OH	-H
マルビジン	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃

【0011】*V. myrtillus*の果実に含まれるアントシアニンは、表1に示したようにR1～R3の置換基が異なる5種類のアントシアニンに3種類の糖（アラビノース、グルコース、ガラクトース）が結合した合計15種類が存在する。尚、以下これらの15種類のアントシアニンを総称して「アントシアニン」と言うこととする。

【0012】【アントシアニンの抽出法】ブルーベリーからのアントシアニンの抽出は、公知の方法で行うことができる。例えば、ブルーベリーの果実をすり潰すことで得られたブルーベリージュースをSep-Pac Plus C18 Cartridgeカラム（Waters社製）に吸着させ、滅菌水で洗浄後、1% HCl-メタノール溶液で溶出させることで、純度90%のアント

シアニン抽出した。

【0013】このようにして得られた抽出液のHPLC（高速液体クロマトグラフィー）によるクロマトグラムを標準品のアントシアニンのクロマトグラムと比較したところ、抽出液には、前記した15種類のアントシアニンが含まれていることが確認された。

【0014】尚、アントシアニンを得るための原料は、ブルーベリーの果実をすり潰したブルーベリージュースに限定されず、市販されているブルーベリー粉末や濃縮液を用いても構わない。

【0015】〔使用法〕このようにして得られたアントシアニンは、薬理的に認容された液体キャリア又は粉末キャリアと混合して種々の形態で用いることが可能であり、例えば、錠剤、散剤、液剤、カプセル剤、注射剤、軟膏、健康補助食品等として使用される。

【0016】錠剤の形態で用いる場合には、薬学的に認容された種々のキャリアを用いることができ、乳糖、ブドウ糖等の賦形剤、水、エタノール等の結合剤、カテン末、乾燥デンプン等の崩壊剤、ステアリン、カカオバター等の崩壊抑制剤、カオリン、ベントナイト等の吸着剤、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を例示できる。

【0017】また、注射剤として用いる場合にはアントシアニン溶液は殺菌され且つ血液と等張であることが好ましく、アントシアニン溶液を希釈する希釈剤としては、薬学的に許容された水、エチルアルコール、プロピレングリコール等を用いることができる。また、血液との等張性を確保するために、食塩、ブドウ糖、グリセリン等を適宜混合しても構わない。

【0018】さらに、健康補助食品とする場合には、散剤、錠剤、液剤等種々の形態で用いることができる。また、着色剤、保存剤、香料、甘味剤等、この分野において従来公知の添加剤を加えることが可能である。

【0019】さらにまた、何れの形態で用いる場合でも、カロチノイドの一種であるルテインを添加すること可能であり、ルテインを添加することで、体内の活性酸素が消去され、抗癌作用だけではなく生活習慣病の予防にも効果を発揮する。また、本実施の形態では、ブルーベリーからアントシアニンを抽出したが、アントシアニンは紫芋、ブドウ、赤キャベツ、茄子等から抽出してもよい。

$$\text{細胞癌化発生率 (\%)} = (\text{実験区のコロニー数} / \text{コントロールのコロニー数}) \times 100 \cdots (1)$$

$$\text{細胞癌化抑制率 (\%)} = 100 - \text{細胞癌化発生率 (\%)} \cdots (2)$$

【0025】

【0020】

【実施例】〔アントシアニン溶液の調整〕ブルーベリー（*V. myrtillus*）の果実をすり潰し、得られたブルーベリージュースをSep-Pac Plus C18 Cartridgeカラム（Waters社製）に吸着させ、滅菌水で洗浄後、1% HCl-メタノール溶液で溶出させることで、ブルーベリー中のアントシアニンを抽出した。このようにして得られた抽出液を温度37℃においてエバポレータにより濃縮後、pHを7.0に調整し、DMSO（ジメチルスルフォキシド）に溶解してアントシアニン溶液を得た。尚、アントシアニンを大量に得たい場合には、カラムとしてSEPHADEX LH-20（Amersham Pharmacia Biotech AB社製：Cat 17-0090-01）を用いることが望ましい。

【0021】〔細胞癌化抑制実験〕アントシアニンによる細胞癌化抑制実験を、薬品や食品の細胞癌化抑制能力を感度良く検出でき、客観的な評価が可能であるコロニーアッセイ法を用いて行った。コロニーアッセイ法とは、癌細胞は寒天培地中で増殖してコロニーを形成するが、正常細胞は寒天培地中では増殖しないことを利用して、発癌プロモーターを加えた寒天培地にて正常細胞を所定期間培養し、正常細胞から癌細胞への転換率を培地中のコロニー数より評価するものである。

【0022】発癌プロモーターTPAを20 ng/ml、及び、前記したアントシアニン溶液を適当量培地に添加し、アントシアニンを0、1、5、10、20 μg/mlそれぞれ含む寒天培地を作成した。これらの培地上にマウス新生児皮膚細胞JB6を10個ずつ散布し、37℃、CO₂濃度5%の環境下で2週間に渡り培養を行った。

【0023】尚、この環境下（発癌プロモーターTPA濃度、培養温度、CO₂濃度）におけるマウス新生児皮膚細胞JB6の2週間後における細胞癌化率は約10%であることが知られている。また、本実施の形態では、発癌プロモーターは、TPAを使用した、TNF-αアルファでもよい。

【0024】2週間の培養後、得られたコロニーを染色液にて染色し、光学顕微鏡でその数を計測した。その結果を表2及び図1に示す。尚、細胞癌化発生率及び細胞癌化抑制率は次の式で求めた。

【表2】

実験区のアントシアニン濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	細胞癌化率 (%)	細胞癌化抑制率 (%)
0 (コントロール)	100	0
1	90	10
5	69	31
10	38	62
20	17	83

注) コントロールにはアントシアニンを含有しない0.1% DMSOを添加した。

【0026】表2及び図1より、アントシアニンは、濃度依存的にマウス新生児皮膚細胞JB6の細胞癌化を抑制することが明らかである。

【0027】また、アントシアニンを抽出する前のブルーベリージュース、及び、市販のブルーベリー粉末を用いて同様の実験を行ったが、同様に、ブルーベリーエキスの濃度に依存して細胞癌化が抑制される。

【0028】〔癌細胞アポトーシス誘導実験〕アントシアニンが癌細胞に及ぼすアポトーシス誘導効果を断片化したDNA量により評価した。

【0029】ヒト急性前骨髄性白血病細胞HL-60を10%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地を用いて培養した。このようにして得られたHL-60細胞を、アントシアニンを0 (0.1% DMSO)、50、100、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ それぞれ含むように調整した前記アントシアニン溶液で6時間処理した。

【0030】処理後、細胞を遠心分離法により回収し、細胞溶解緩衝液により細胞膜を取り除き、RNA分解酵素によりRNAを分解し、タンパク質分解酵素によりタンパク質を除去し、得られたDNA断片を2%アガロースゲル電気泳動法により分離し、染色後、UVトランスレータにより検出し、DNAの断片化率を評価した。その結果を、表3及び図2に示す。

【0031】

【表3】

アントシアニン濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	DNA断片化率 %
0 (DMSO)	3
50	12
100	41
150	80

【0032】表3及び図2に示すように、ブルーベリー由来のアントシアニンの濃度が高くなるほど、アポトーシスの指標となるDNA断片化率が増加しており、アントシアニンは、ヒト急性前骨髄性白血病細胞HL-60のアポトーシスを濃度依存的に誘導することが明らかである。

【0033】

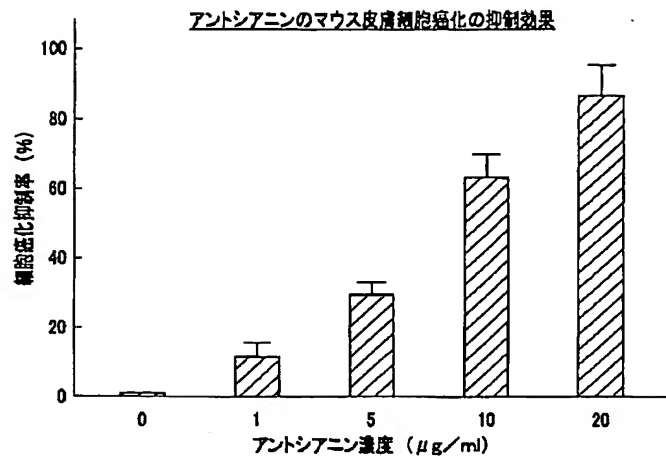
【発明の効果】本発明は次のような顕著な効果を奏する。本発明の抗癌剤の有効成分であるブルーベリーより抽出されるアントシアニン誘導体（アントシアニン）は、前記したように、細胞の癌化を防止する（抗癌作用）と共に、癌細胞のアポトーシスを誘導する効果がある。

【図面の簡単な説明】

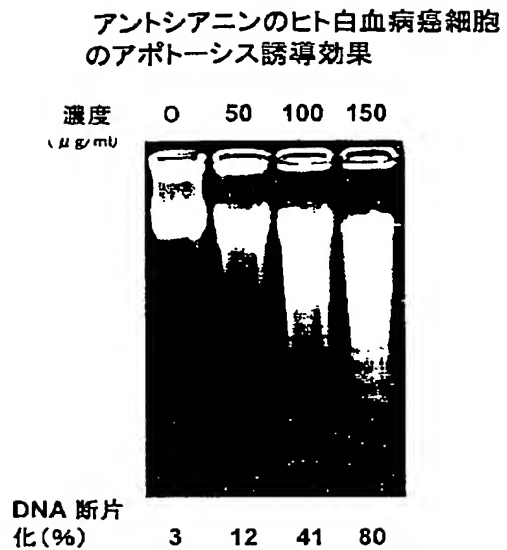
【図1】アントシアニンのマウス皮膚細胞癌化抑制効果を示すグラフである。

【図2】アントシアニンによるヒト急性前骨髄性白血病細胞のDNA断片化率を示す電気泳動の結果である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

A 6 1 K 35/78

A 6 1 P 35/00

// C 0 7 H 17/065

F I

A 6 1 K 35/78

A 6 1 P 35/00

C 0 7 H 17/065

ターマコード (参考)

C

F ターム (参考) 4B018 MD08 MD52 ME08

4C057 CC01 DD01 KK07

4C076 AA11 AA30 BB01 CC27 FF02

4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04

MA16 MA43 NA14 ZB26

4C088 AB44 AC04 BA10 CA06 MA52

NA14 ZB26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.